Nicht im Handel

Sonderabdruck aus Band IX, Heft 3, 1959, des

ARCHIV FÜR DIE GESAMTE VIRUSFORSCHUNG

Springer-Verlag in Wien — Alle Rechte vorbehalten

Aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für biologische Schädlingsbekämpfung, Darmstadt
(Leitung: Oberregierungsrat Dr. *J. Franz*)

Untersuchungen über den Verlauf der Granulose bei Raupen von Choristoneura murinana (Hb.) (Lepidopt., Tortricidae)*

Von

Gertraude Wittig

Mit 13 Abbildungen

(Eingegangen am 4. März 1959)

I. Einleitung

Die vorliegende Untersuchung wurde ausgeführt als Beitrag zu einem größeren Arbeitsprojekt des Institutes für biologische Schädlingsbekämpfung, Darmstadt, über Populationsdynamik und biologische Bekämpfung des Tannentriebwicklers *Choristoneura murinana* (Hb.). In diesem Rahmen war eine Arbeit über seine Kapselvirose wünschenswert geworden. Darin sollten an Hand einer lichtmikroskopischen Untersuchung der Verlauf der Krankheit geklärt und Anhaltspunkte für die Möglichkeit einer biologischen Bekämpfung gewonnen werden.

Durch diese technische Beschränkung stand von vornherein fest, daß bloß ein kleiner Teil der bei der Bearbeitung einer Virose anfallenden morphologischen Probleme angeschnitten werden konnte. Da Viren und Kapseln in submikroskopischen Bereichen bzw. an der Grenze des Auflösungsvermögens des Lichtmikroskops liegen, können mit einer derartigen Untersuchung in der Hauptsache die Veränderungen in den Zellen, d. h. ihre Degeneration, verfolgt werden. Die Arbeit führte damit zu der allgemeinen Frage, was eine mit dem Lichtmikroskop betriebene histopathologische Untersuchung heute noch leisten kann und welchen Wert ihre Ergebnisse für die Insektenpathologie besitzen.

* 5. Beitrag zu: „Populationsdynamik und biologische Bekämpfung des Tannentriebwicklers" gemeinsam bearbeitet von *J. Franz* und *H. Löhrl*.

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
26 JAN 1960

Im einzelnen wurden bearbeitet: Die Veränderungen des Chromatins, das Fadenwerk (das schon zuvor von Herrn Oberregierungsrat Dr. *R. Langenbuch* im Institut für biologische Schädlingsbekämpfung, Darmstadt, nach Anwendung seiner speziell für Polyeder ausgearbeiteten Eisenhämatoxylin-Technik beobachtet worden war) und die Reaktion des Blutes auf die Infektion (an anderer Stelle veröffentlicht). Auf die Bedeutung der beobachteten Veränderungen für die Methode der Diagnose, wie sie z. B. bei der Untersuchung von Freilandpopulationen angewandt werden kann, wurde an anderer Stelle eingegangen (*Wittig* 1957).

Für die biologische Beurteilung dieser Viruskrankheit liefert die vorliegende Untersuchung neben einer allgemeinen Kenntnis des Krankheitsablaufs Beiträge zu folgenden Problemen: Abhängigkeit des Krankheitsverlaufs von Zuchttemperatur und Infektionsalter der Raupen, Entwicklungsverzögerung der infizierten gegenüber den Kontrollraupen, Blutreaktion und Regenerationsvorgänge als Ausdruck der Reaktion des Wirts auf die Infektion, Einfluß der Granulose auf parasitische Schlupfwespen und auf die Kernpolyedrose.

Herrn Professor Dr. *H. Weber* † bin ich für die entscheidende Förderung meiner Arbeit zu großem Dank verbunden. Leider konnte er den Abschluß dieser Untersuchungen, deren Fortgang er bis zuletzt mit Interesse verfolgt hat, nicht mehr erleben. Nach seinem Tode haben Herr Professor Dr. *K. G. Grell* und Herr Professor Dr. *G. Krause* es mir freundlicherweise ermöglicht, meine Arbeit am Zoologischen Institut in Tübingen fortzuführen, wofür ich beiden aufrichtig danke. Herrn Oberregierungsrat Dr. *J. Franz* bin ich zu besonderem Dank verpflichtet für die Überlassung des Themas und für seine Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit. Seinen Mitarbeitern am Institut für biologische Schädlingsbekämpfung in Darmstadt, insbesondere Herrn Oberregierungsrat Dr. *R. Langenbuch* und Herrn Dr. *A. Krieg*, danke ich für die liebenswürdige Berücksichtigung meiner Materialwünsche und für Anregungen verschiedener Art.

Die Untersuchungen wurden mit einem Forschungsstipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bad Godesberg, durchgeführt.

II. Material und Technik

Die Untersuchung wurde an Raupen des Tannentriebwicklers *Choristoneura murinana* (Hb.) ausgeführt, die im Gebiet von Gernsbach/Murgtal (nördlicher Schwarzwald) 1956 und 1957 gesammelt worden waren. Von einem Auftreten der Kapselviruskrankheit in diesem Gebiet hatten *Bergold* 1948 und *Bucher* 1953 berichtet, und *Bucher* 1953 gab an, daß 26% der von ihm 1948 dort gesammelten Raupen an der Viruskrankheit zugrunde gingen. Das in dieser Untersuchung verwendete Raupenmaterial war praktisch frei von der Granulose; auf eine latente Verseuchung wurde es allerdings nicht geprüft.

Die *Infektion* erfolgte durch Verfüttern von Tannentrieben, die mit einer

Kapselsuspension* des Erregers Bergoldia calypta bestrichen worden waren. Daran fraßen die Raupen mehrere Tage bis zum Verschwinden einer gewissen Nadelmenge und kamen dann wieder auf unbehandeltes Futter. Im folgenden wird mit „Infektionsbeginn" der Zeitpunkt des Übertragens der Raupen auf infiziertes Futter bezeichnet. Die Raupen wurden in Petrischalen gehalten, je nach Raupengröße meist 3 bis 5 Raupen zusammen. Eine gute Sauberhaltung der Schalen sowie ihre gelegentliche Sterilisation erwiesen sich dabei als günstig. Infektionsversuche wurden bei folgenden mittleren Raumtemperaturen durchgeführt (Tab. 1).

Tabelle 1. Raumtemperaturen in ° C

mittlere Raumtemperatur	13,5	17	19	20,3	23,5
tägliche Schwankungen im Bereich von	12—15	16—18	16,5—19,5	19—22	20,5—24,5
gelegentliche Extreme	10—16	14—19		18—25	

Die Schalen wurden alle 2 bis 3 Tage nachgesehen.

Die Messung der Kopfkapselbreite und die Berechnung der Zahlenwerte wurde gemäß *Wittig* 1959a ausgeführt. Die im Abschnitt III C genannten Wahrscheinlichkeiten P wurden nach den wissenschaftlichen Tabellen der *J. R. Geigy* AG. berechnet.

Für die *histologischen Untersuchungen* wurden aus einer bei 19° C gehaltenen Infektionsreihe alle 2 Tage etwa 10 Raupen fixiert. Zur Verwendung kamen vor allem Fixierungsgemische nach *Bouin-Allen*, *Duboscq-Brasil*, *Regaud* und *Zenker*, gelegentlich auch Fixierungsgemische nach *Bouin*, *Carnoy*, *Gendre* und *Gilson* sowie gepufferte Osmiumsäurelösung nach *E. Heitz* (mündliche Mitteilung). Die meist 6 μ dicken Paraffinschnitte wurden zum größten Teil nach *Feulgen* (*Romeis* 1948, Gegenfärbung mit Lichtgrün) gefärbt. Zur Darstellung der Nucleolen wurden noch Methylblau-Eosin nach *Mann* und *Feulgen*-Säurefuchsin-Lichtgrün (*Heidenreich* 1940) benutzt. Ferner wurden von einer bei 23,5° C gehaltenen Infektionsreihe alle 2 bis 3 Tage etwa 5 Raupen fixiert und geschnitten; insgesamt wurden 120 infizierte Raupen untersucht.

Als histochemische Reaktion auf Desoxyribonucleinsäure gestattete die *Feulgen*-Färbung exakte Aussagen über die Chromatinveränderungen; sie war außerdem unter diesem Gesichtspunkt bei Granulosen bisher noch nicht verwendet worden. So konnte durch das Verfolgen der Veränderungen in den Kernen eine gewisse Kenntnis vom Ablauf der histopathologischen Vorgänge gewonnen werden, die bei der Feststellung von Veränderungen im zeitlichen Ablauf, bei der Einordnung weiterer histopathologischer Befunde und bei der Beurteilung von Sonderfällen als Grundlage diente.

* Für die Überlassung der beiden Kapselsuspensionen bin ich Herrn Dr. *A. Krieg*, Institut für biologische Schädlingsbekämpfung, Darmstadt, zu herzlichem Dank verpflichtet.

Eine befriedigende Darstellung des Fadenwerks im Schnitt gelang nur in einigen Fällen. Sie erwies sich als stark abhängig von der Fixierung. Während bei Fixierung mit Gemischen nach *Regaud* und *Zenker* sowie gepufferter Osmiumsäure Erfolge erzielt werden konnten, versagte nach *Bouin-Allen, Duboscq-Brasil, Carnoy* und *Gendre* fixiertes Material weitgehend. Die besten und klarsten Bilder erbrachte die Eisenhämatoxylinfärbung nach *Heidenhain* bei Vorbehandlung der Schnitte mit n-Salzsäure (bei 60° C) oder 5%iger Karbolsäure (*Langenbuch* 1955). Eine Vorbehandlung mit Eisessig, Pikrinsäure- oder Natriumcarbonatlösung war weniger günstig. Mit Molybdänhämatoxylin nach *Held*, saurem Hämatoxylin nach *Ehrlich* und Methylenblau-Eosin nach *Mann* färbte sich das Fadenwerk wesentlich schlechter an. Eine Anfärbung mit *Feulgen* war auch bei verlängerter Hydrolyse nicht möglich.

III. Der äußere Verlauf der Krankheit

A. Die äußeren Symptome

Bis ins 5. Larvenstadium (L5) hinein sind die gesunden Tannentriebwicklerraupen gelblich gefärbt. Im 6. Larvenstadium (L6) haben sie eine gelbgrüne bis grasgrüne Färbung, und der Fettkörper schimmert bei älteren Raupen gelblich durch die Haut durch.

Die ersten Anzeichen der Erkrankung äußern sich in einer beginnenden Weißfärbung, die stetig zunimmt. Im Anfangsstadium I sind die Raupen undeutlich weiß-grün gefleckt, im mittleren Stadium II völlig weiß und prall. Das länger dauernde Endstadium III beginnt, wenn die Raupen schlaff und träge werden. Die Nahrungsaufnahme hört dann auf, und die weißlich-grauen Raupen sind schließlich nur noch in der Lage, Kopf- und Mandibelbewegungen auszuführen. Sie galten als „tot", wenn sie auf ein Anstupfen mit der Nadel nicht mehr reagierten.

Bei den L6 sind die ersten Anzeichen der Erkrankung wegen des oft noch gering entwickelten Fettkörpers nicht immer völlig sicher und bei den L5 kaum festzustellen. Eine Verwechslung mit parasitierten Raupen ist durchaus möglich. Im übrigen hat bereits *Bucher* 1953 die äußeren Veränderungen bei den kranken Raupen im Vergleich zu den gesunden beschrieben.

B. Die Abhängigkeit des Krankheitsverlaufs von der Temperatur

Die Geschwindigkeit des Krankheitsverlaufes ist temperaturabhängig. Mit abnehmender mittlerer Raumtemperatur verzögern sich die Zeitpunkte des Auftretens der ersten Anzeichen und die Zeitspannen, innerhalb deren der Tod eintritt (s. Abb. 1). Letztere verlängern sich auch bei tieferen Temperaturen, während bei höheren die Todesfälle zeitlich mehr zusammenfallen. Überhaupt war das äußere Krankheitsbild in dem 13,5°-Versuch sehr viel uneinheitlicher als in den anderen Infektionsreihen, und die toten Raupen waren stets, die spätkranken zum Teil verpilzt.

Dieses Ergebnis stimmt überein mit dem, was *Tanada* 1953 bei der Untersuchung der Granulose von *Pieris rapae* L. erhalten hat. Bezüglich des Einflusses der Temperatur auf die histopathologischen Veränderungen vgl. S. 379.

C. Die Entwicklung infizierter Raupen im Vergleich zur Kontrollentwicklung und die Abhängigkeit des Infektionserfolges vom Alter der Raupen

In der Tabelle 2 ist die Entwicklung der infizierten (J) und der Kontrollraupen (N) in einem im Mai 1957 durchgeführten Versuch dargestellt. Infizierte Raupen waren nur bis kurz vor dem Auftreten der ersten äußeren Anzeichen in der Lage, Larvenhäutungen auszuführen. Die als L5 eingesetzten infizierten und Kontrollraupen hatten sich bis dahin zur L6 entwickelt. Bei den als L4 eingesetzten infizierten Raupen konnte

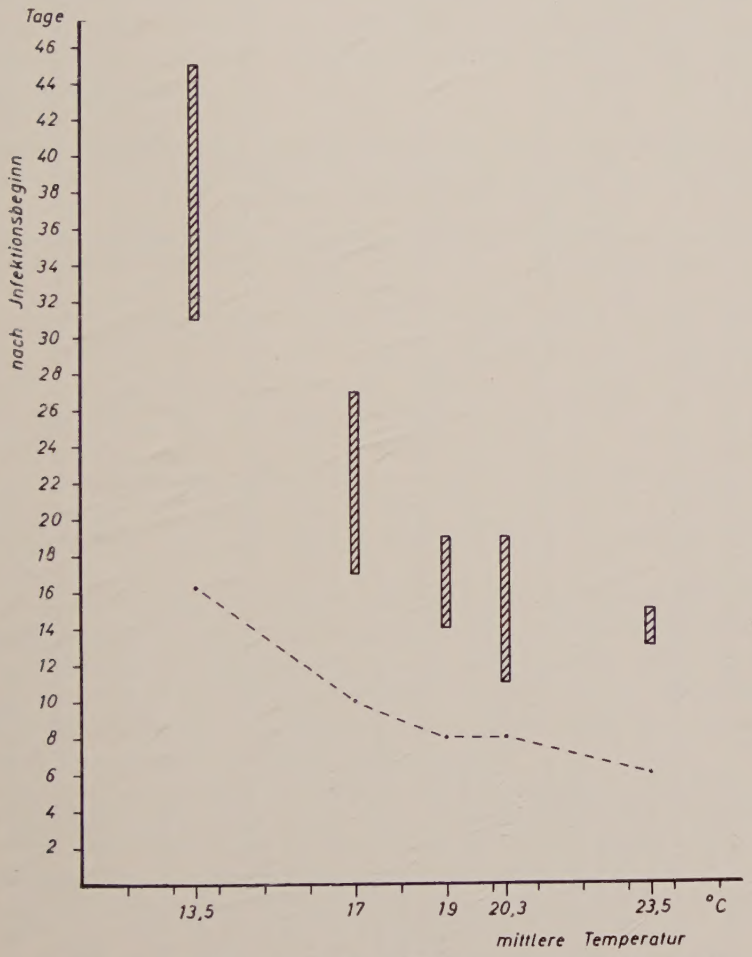

Abb. 1. Abhängigkeit des Krankheitsverlaufes von der Temperatur. Punkte: erste Anzeichen der Erkrankung, Säulen: Zeitspanne, in der der Tod eintrat.

Tabelle 2. Ergebnisse der Infektion mit dem Kapselvirus an Raupen des 4. u. 5. Stadiums (L4 bzw. L5) von *Choristoneura murinana* (Hb.). J = infizierte Raupen, N = Kontrollen

Versuch-Nr.	JIa	JIb	NIa	NIb	JIIa	JIIb	NIIa	NIIb	JIII	NIII
Anzahl und Stadium bei Infektionsbeginn	41 L_4	35 L_5	25 L_4	25 L_5	35 L_4	40 L_5	25 L_4	25 L_5	50 L_5	50 L_5
mittlere Raumtemperatur °C	20,3				17				13,5	
erste Anzeichen: Tage nach Infektionsbeginn	8				10				>16	
Anzahl L_5:L_6 zu diesem Zeitpunkt (s. Anm.)	15:16		3:19		10:20		0:12			
Verpuppung: Tage nach Infektionsbeginn	—	8—11	12—17	8—12	—	11—13	14—22	12—17	16—21	21—26
Anzahl der Puppen	—	6			—	4			3	
Anzahl der L_6 kurz vor der Verpuppung (s. Anm.)		33				35			39	
Puppenentwicklung: Imagines		2				1			—	
Puppe +, Kapseln nicht gefunden		2				—			—	
Puppe +, Kapseln gefunden		2				3			3	
Tod (durch Granulose) Tage nach Infektionsbeginn		11—19				15—27			31—45	

Anm.: nicht parasitierte Larven.

jedoch in dem Zeitraum bis zum Sichtbarwerden der äußeren Symptome eine Verzögerung ihrer Entwicklung beobachtet werden, da sie nicht in gleichem Maße das Stadium L6 erreichten wie ihre Kontrollen (statistische Sicherung für die Versuchsgruppe Ia mit $P<0{,}01$, für die Versuchsgruppe IIa mit $P<0{,}05$).

Der Unterschied im Zahlenverhältnis L5 : L6 bei den Versuchsgruppen J Ia und J IIa ist statistisch nicht gesichert.

Weiterhin wird durch die Infektion die Dauer der Larvenperiode zeitlich verlängert, wie ein Vergleich des Zeitraums der Verpuppung bei den Kontrollraupen* mit dem des Todes bei den infizierten Raupen zeigt.

Die Beeinträchtigung der Raupenentwicklung durch die Granulose drückt sich auch in der Kopfkapselbreite aus. Sie bleibt im Mittel bei kranken L6 kleiner als bei gesunden (Tabelle 3). Diese Differenz ist statistisch gesichert.

Tabelle 3. Ergebnisse der Kopfkapselbreitenmessung an gesunden L6 aus dem Freiland (nach *Wittig* 1959a) und an granulosekranken L6 (in mittleren Larvenstadien infiziert)

n = Anzahl der Raupen, M = Mittelwert der Kopfkapselbreite, σ = mittlere Abweichung, D = Differenz der Mittelwerte, σ_D = Fehler der Mittelwertsdifferenz.

Gruppe	n	M (10^{-3} mm)	σ (10^{-3} mm)	D (10^{-3} mm)	σ_D (10^{-3} mm)
L6 ♂ (gesund)	159	1.559	53,0		
L6 ♂ (krank)	32	1.521	83,5	38	11,5
L6 ♀ (gesund)	146	1.727	51,3		
L6 ♀ (krank)	41	1.672	74,7	55	10,1

Als grober Maßstab für die Wirksamkeit der Infektion kann die Anzahl derjenigen Raupen angesehen werden, die es noch zur Verpuppung gebracht haben. Von den als L4 infizierten Raupen hatte sich keine verpuppt (s. Tabelle 2). Bei insgesamt 107 Raupen, die als L5 infiziert worden waren, kam es in 13 Fällen zu einer Verpuppung; aber nur 3 der Puppen entwickelten sich bis zur Imago weiter.

Diese 3 Imagines zeigen, daß die Infektion entweder nicht immer wirksam wird oder überwunden werden kann. Nach den Untersuchungen *Tanadas* 1953 an *Pieris rapae* kann dabei die Temperatur eine Rolle spielen.

Während also bei einer Infektion in mittleren Raupenstadien (L4 und L5) ein sehr weitgehender Erfolg erzielt werden kann, ist er bei Infektion

* In den Verpuppungszeiten der Kontrollraupen erkennt man die bekannte Abhängigkeit der Verpuppung von Einsatzalter und Zuchttemperatur.

im Spätstadium wesentlich geringer. In Tabelle 4 ist das Ergebnis einer Spätinfektion dargestellt, die an 73 fortgeschritteneren L6 durchgeführt wurde. Hier zeigten nur 3 Raupen die bekannten äußeren Symptome der Erkrankung, aber der Krankheitsverlauf war nicht typisch. Zur Verpuppung gelangten fast 80% der nichtparasitierten Raupen. Die Puppensterblichkeit war mit rund 30% gegenüber der an den Kontrollen beobachteten von rund 2% bemerkenswert hoch.

Tabelle 4. Ergebnis der Spätinfektion von 73 fortgeschritteneren L6 von *Choristoneura murinana* (mittlere Raumtemperatur: 19° C). Verpuppung 5 bis (maximal) 15 Tage nach Infektionsbeginn

	L6	Puppen	Imagines
Gesamtzahl	73	46	24
Parasitische Schlupfwespen geschlüpft aus	15	—	—
gestorben	10	14	2 (beim Schlüpfen)
lebend fixiert	2	8*	8*
zur Weiterzucht	46	24	12**

* von diesen wurden insgesamt 12 Puppen und Imagines im Schnitt untersucht, s. S. 384.

** Die Weiterzucht ging bis zur L2.

Dieser Unterschied im Infektionserfolg bei Infektion im mittleren bzw. späten Raupenstadium ist, wegen der Vergleichbarkeit des in den Tabellen 2 und 3 gegebenen Zahlenmaterials, als gesichert anzusehen. Die Verpuppungszeit der spätinfizierten Raupen entsprach etwa der der Kontrollen (s. auch Tabelle 384).

IV. Die Histopathologie der Granulose

A. Bei Raupen

1. *Die Degeneration des Zellkerns*

Die pathologischen Veränderungen lassen zwei Vorgänge unterscheiden. Der eine besteht in einer sukzessiven Vergrößerung des Zellkerns und der ganzen Zelle. Sie spielt sich bei den Kernen des Fettkörpers in dem Zeitraum von 4 bis 12 Tagen nach Infektionsbeginn ab (s. Tabelle 5). Nach 10 Tagen hat sich z. B. der Kerndurchmesser verdoppelt. Die Vergrößerung der Epidermis ist gegenüber der des Fettkörpers zeitlich etwas

Tabelle 5. Vergrößerung des Fettkörpers und der Epidermis von Tannentriebwicklerraupen nach Infektion mit Kapselviren (L6, mittlere Raumtemperatur 19° C). Vgl. Text

Tage nach Infektionsbeginn	Fettkörperkerne, ∅ *	**	Höhe der Epidermis (in μ)
0	7,4	1	2,8— 4,2
2	7,5	0,8	2,8— 4,2
4	8,9	7,5	4,2
6	10,1	15	4,2— 7,0
8	12,3	39	meist 7
10	15,8	70	7 —14
12	19,7	88	21 —28
14	21,1	90	14 —28
16			28 —56
18			35 —42

* = Mittelwerte des größten Kerndurchmessers in μ, berechnet aus je 100 Kernmessungen an jeweils 2 Raupen. Normalwert aus 400 Messungen berechnet.

** = Anzahl der Kerne in %, deren Durchmesser $\geq 14\,\mu$ war.

verzögert. Sie ist sehr auffällig und kann zu einer Epithelerhöhung auf mehr als das 10fache führen. Wie schon *Martignoni* 1957 bei *Eucosma griseana* (Hb.) gefunden hat, wölbt sich die Epidermis dann faltenartig in die Leibeshöhle vor.

Bei gesunden *C. murinana*-Raupen sind die Fettkörperkerne kugelig bis eiförmig und ihr größter Kerndurchmesser bleibt bei der L6 meist $<14\,\mu$. Gelegentlich findet man auch wesentlich größere und unregelmäßig gestaltete Kerne. Entsprechende Kerne sind von *Risler* 1950 bei *Ptychopoda seriata* Schrk. beschrieben und als okto- oder 16-ploide-Kerne gedeutet worden.

Die Vergrößerung der Kerne nach der Infektion ist vor allem pathologisch bedingt und führt ebenfalls zu einem Verlust ihrer regelmäßigen Gestalt (s. unten). Eine genaue Volumenbestimmung ist dann nach den üblichen Methoden der Kernmessung nicht mehr möglich, zumal Kernanschnitte später nicht mehr erkannt werden können. Um die enorme Vergrößerung überhaupt zu veranschaulichen, wurde der Mittelwert aus dem größten Kerndurchmesser gewählt. Dieser stellt somit lediglich eine ungefähre Größenangabe sowie eine bestimmte Entwicklungstendenz dar (übereinstimmend mit dem Ansteigen des Mittelwertes steigt auch der Prozentsatz der Kerne, deren größter Durchmesser $\geq 14\,\mu$ ist).

Mit der Vergrößerung ist verbunden eine Degeneration der Zelle, die sich vor allem in einer Auflösung der geformten Kernbestandteile äußert. Sie vollzieht sich in drei Stadien, zwischen denen Übergänge gefunden worden sind. Im folgenden wird sie am Kern einer Fettzelle erläutert.

Der eiförmige bis kugelige Normalkern (Färbung nach *Feulgen*,

s. Abb. 2) ist dicht angefüllt mit Chromatinkörnchen, die ziemlich gleichmäßig im Kern verteilt sind. Wegen der dichten Packung der Chromatinkörnchen sind die Nucleolen bei einer Gegenfärbung mit Lichtgrün kaum sichtbar. Stellt man sie mit anderen Methoden dar, so findet man entweder einen größeren, unregelmäßig gestalteten Nucleolus (oft in kleineren Kernen) oder mehrere kleinere, runde oder längliche Nucleolen.

Im ersten Stadium der Veränderung (Stadium A, Abb. 3) sind die Chromatinkörnchen an die Peripherie des Kerns gerückt und mehr oder

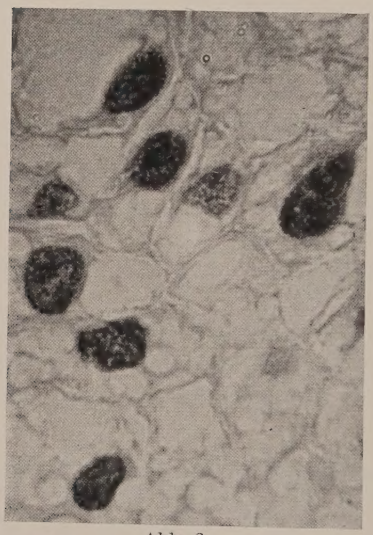

Abb. 2

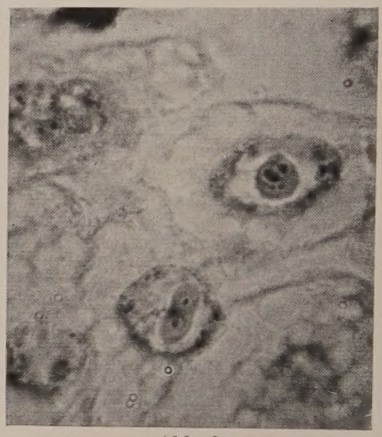

Abb. 3a

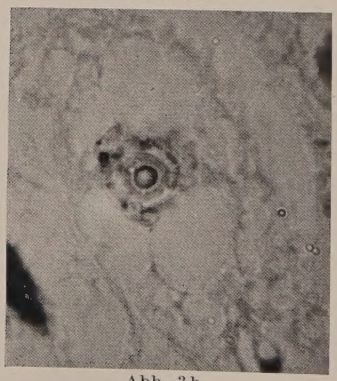

Abb. 3b

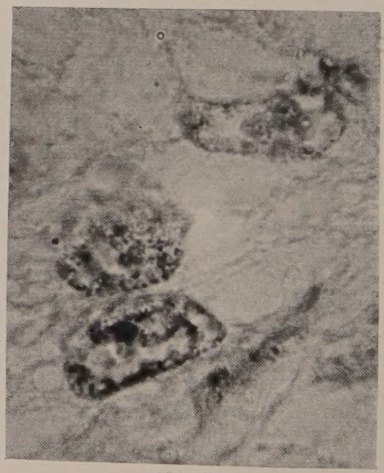

Abb. 3c

Abb. 2. Normaler Fettkörper. Fixierung: *Regaud*, Färbung: *Feulgen*. Vergrößert 1100×.
Abb. 3. Stadium A. Vergrößert 1100×. a) und b) Chromatinkörnchen an der Peripherie des Kerns, Nucleolen mit Vakuolen. Fixierung: *Gilson*, Färbung: *Feulgen*. 8 Tage nach Infektionsbeginn. c) Chromatinkörnchen in Strängen angeordnet. Fixierung: *Zenker*, Färbung: *Feulgen*. 6 Tage nach Infektionsbeginn.

weniger in Strängen angeordnet. Obwohl feulgennegativ, treten die Nucleolen jetzt auch bei den *Feulgen*-Präparaten deutlich hervor. Sie sind anscheinend vergrößert und enthalten oft eine oder mehrere Vakuolen, das sind Bläschen mit schwächerer Lichtbrechung. Manchmal sind sie zu einer einzigen Nucleolarmasse verklumpt, die die Größe eines kleinen Normalkerns haben kann.

Beim Übergang von A nach B beginnen die Chromatinkörnchen zu verklumpen und im Kern treten rosafarbene bis rötliche „Schwaden" auf.

Im Stadium B (Abb. 4) sind die Chromatinkörnchen zu unregelmäßigen Chromatinmassen verklumpt. Der Kernraum wird von homogenen,

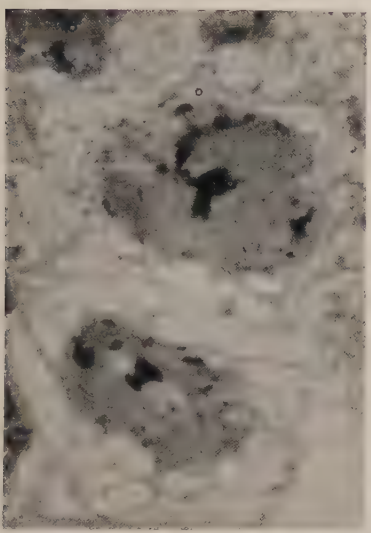

Abb. 4a

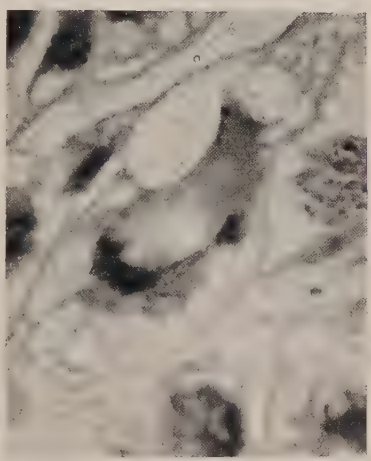

Abb. 4b

Abb. 4. Stadium B. Vergrößert 1100 ×. a) Fixierung: *Bouin*, Färbung: *Feulgen*. 10 Tage nach Infektionsbeginn. b) Fixierung: *Regaud*, Färbung: *Feulgen*. 6 Tage nach Infektionsbeginn. Rechts neben dem großen Kern im Stadium B ein Kern im Stadium A. Die stärkere Granulierung der Kerne in a) ist durch die Fixierung bedingt.

intensiv rosaroten „Schwaden" ausgefüllt, die sich aber nicht ganz so kräftig wie das Chromatin anfärben. Die Größe der schollenartigen Chromatinpyknosen nimmt ab. Das Chromatin wird somit aufgelöst. Auch die Nucleolen verschwinden. Der vergrößerte Kern greift oft mehr oder weniger lappig zwischen die Plasmavakuolen der Fettzelle vor.

In den Epidermiszellen sammelt sich das pyknotische Chromatin oft an einem Pol des Kernraums an.

Schließlich sind alle Chromatinpyknosen verschwunden und die intensiv rosarote Färbung des Kernraums ist verblaßt. Die stark vergrößerte

„Kernregion" läßt sich jetzt nur noch an ihrer leichten Rosafärbung erkennen, die je nach Fixierung mehr homogen oder mehr netzartig-fädig erscheint; außerdem enthält sie keine Vakuolen wie das Plasma der Fettzelle (Stadium C, Abb. 5).

2. *Der Krankheitsverlauf in den verschiedenen Geweben* (s. Tabelle 6)

Die frühesten Chromatinveränderungen treten im Fettkörper auf. An diesen läßt sich die Erkrankung bei einer mittleren Zuchttemperatur von 19° C erstmals 6 Tage nach Infektionsbeginn — also noch vor dem Erkenn-

Abb. 5a

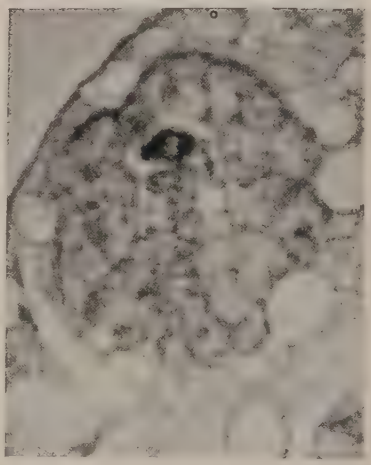

Abb. 5b

Abb. 5. Stadium C. Vergrößert 1100 ×. a) Fixierung: *Regaud*, Färbung: *Feulgen*. 16 Tage nach Infektionsbeginn (gleiche Raupe wie in Abb. 11). b) Fixierung: *Gendre*, Färbung: *Feulgen*. 14 Tage nach Infektionsbeginn.

barwerden äußerer Symptome — sicher diagnostizieren. Meist sind die Kerne im Stadium A, seltener noch normal und manchmal im Übergangsstadium AB. Wichtig für die Diagnose sind die gelegentlich auftretenden B-Kerne.

Sie sind stets $< 14\,\mu$ und zeigen somit, daß die Kernveränderungen auch ohne eine erkennbare Vergrößerung des Kerns einsetzen können.

2 Tage später, also nach 8 Tagen, treten schon alle drei Stadien der Kernveränderung auf. Allerdings ist das Stadium C noch selten, B herrscht vor und A ist häufig anzutreffen. Nach 10 Tagen überwiegen die Stadien B und C, und nach 12 Tagen haben die meisten Fettzellen das Stadium C erreicht. Von 12 Tagen ab setzt die Auflösung der Fettzellen ein, die von einem Verlust der Plasmavakuolen eingeleitet wird.

Tabelle 6. Ablauf der pathologischen Veränderungen in den Geweben granulose-kranker Tannentriebwickler-Raupen (mittlere Raumtemperatur 19° C). Fettgedruckte Stadien = überwiegend vorhanden

Tage (nach Infektionsbeginn)	Fettkörper	Epidermis	Oenocyten	Muskeln	Tracheen
2					
4					
6	**A**, B	A?			
8	A, **B**, C	**A**, B			
10	A, **B, C**	**A, B, C**	Vakuolen im Plasma		
12	B, **C**	A, **B, C**	„	beginnende Schädigung	gelegentlich verändert
14	**C**	**B, C**	„	vakuolisiert	„
16	**C**	**C**	Vakuolen, Chromatinnetz	„	„
18	**C**	**C**	Vakuolen, Chromatinnetz	„	„

In der Epidermis laufen die Veränderungen in der gleichen Weise und nur zeitlich verzögert ab. Deutlich erkennbar wird die Infektion hier erst nach 8 Tagen. Dann sind die Kerne meist im Stadium A, manchmal schon im Stadium B, z. T. auch noch unverändert; außerdem ist das Epithel deutlich erhöht. Das Stadium C erreichen die Epidermiszellen erst nach 14 bis 16 Tagen. Die Zellen der Imaginalanlagen zeigen jedoch keine histopathologischen Veränderungen. Diese Anlagen haben die Gestalt von Scheiben und Einstülpungen, an denen sich in üblicher Weise die Bildung der pupalen Bein- und Flügelscheiden und die Ausbildung der ektodermalen Teile der Geschlechtsorgane der Imago vorbereitet.

Die Tracheenmatrix zeigt Veränderungen erst spät, nur stellenweise und nicht bei allen Raupen.

In der Muskulatur sind Schädigungen von 12 Tagen ab zu erkennen. Sie beginnen damit, daß die Muskelfasern ein aufgelockertes und gequollenes Aussehen bekommen. Schließlich wird das Muskelplasma vakuolisiert (Abb. 6). Die Kerne zeigen dann teils das Anfangs- oder das mittlere Stadium der am Fettkörper beobachteten Chromatinveränderung, teils sind sie stark pyknotisch oder karyorrhektisch.

Eigenartig und unterschiedlich ist das Verhalten der Oenocyten. Nach 10 Tagen findet man sie oft mit Vakuolen im Plasma (Abb. 7); der Kern ist gelappt oder verzweigt und kann später ziemlich lange Verzweigungen aufweisen, aber das Chromatin ist stets gekörnelt. Nach 16 Tagen

treten außerdem stark vergrößerte Oencyten auf, ferner solche, deren Chromatin seine Körnelung verloren hat (Abb. 8). Es bildet im Kernraum ein dickes und engmaschiges rotes Netz, von dem ein dünnes und weitmaschiges rosa Netz ins Plasma ausstrahlt.

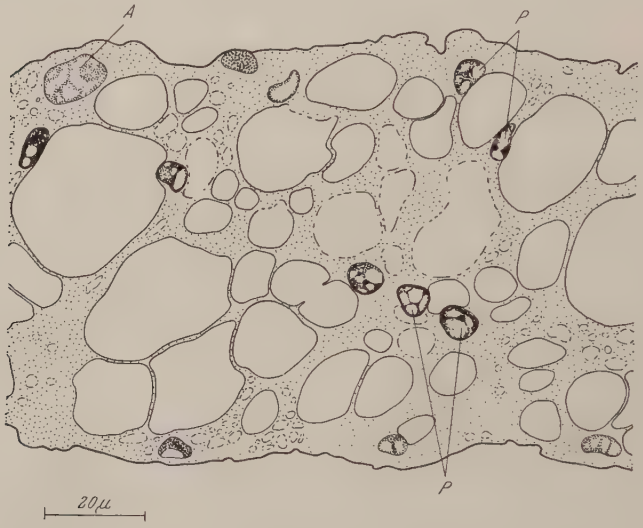

Abb. 6. Schnitt durch einen Muskel mit stark vakuolisiertem Plasma und pyknotischen Kernen (P), 16 Tage nach Infektionsbeginn. Vgl. Text. A = Kern im Stadium A.

An den übrigen Organen (wie z. B. Darmtrakt, Nervensystem, Geschlechtsorgane) konnten keine Veränderungen festgestellt werden. Von einer möglichen Vergrößerung abgesehen, die aber nicht weiter verfolgt wurde, werden auch die Pericardialzellen nicht verändert. Die Veränderungen der Blutzellen sind an anderer Stelle beschrieben worden (*Wittig* 1959b). Die Zellen in den hämopoetischen Organen bleiben unverändert.

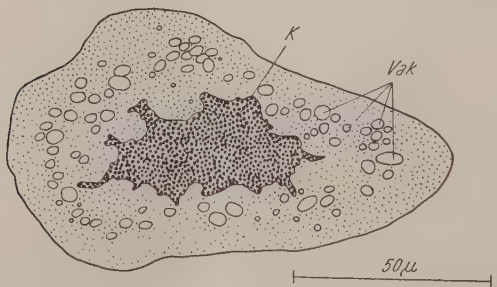

Abb. 7. Schnitt durch einen Oenocyten, 10 Tage nach Infektionsbeginn. K = Kern, Vak = Vakuolen.

Hämopoetische Organe sind durch die Untersuchungen *Arvy's* 1953 für Lepitopteren bekannt geworden. Bei *C. murinana* liegen sie im Meso- und Methatorax den Flügelanlagen auf. Die undifferenzierten Hämozyten im mittleren Teil des hämopoetischen Organs werden von einer membranösen Hülle umgeben, während die davor und dahinter

liegenden Ansammlungen differenzierterer Hämozyten nicht in eine Membran eingeschlossen sind.

Bei 23,5° C mittlerer Raumtemperatur laufen alle diese Veränderungen in der gleichen Reihenfolge, nur entsprechend schneller ab.

Bei hungernden Raupen wird der Fettkörper stark reduziert und die Fettzellen verlieren ihre Vakuolen (Abb. 9). Wenn infizierte Raupen vorübergehend hungern, so verlieren die Fettzellen ebenfalls ihre Vakuolen; die Vorgänge im Kern werden aber nicht beeinträchtigt.

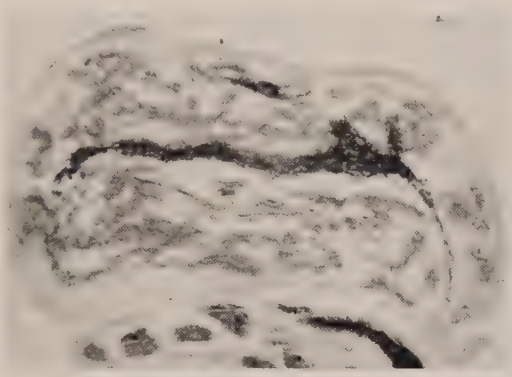

Abb. 8. Oenocyt mit dunkel angefärbtem, netzartigem Chromatin im Kern und hellerem feulgenpositivem Netz im Cytoplasma. Fixierung: *Regaud*, Färbung: *Feulgen*. 16 Tage nach Infektionsbeginn. Vergrößert 500 ×.

3. *Regeneration*

Den in den beiden vorhergehenden Abschnitten beschriebenen, umfangreichen Degenerationsvorgängen stehen andere gegenüber, die in sehr viel geringerem Maße in Fettkörper und Epidermis einen teilweisen Ersatz der befallenen Gewebe bewirken. Sie können als eine Regeneration angesehen werden, die über ihren Anfang nicht hinausgekommen ist. Die Vermutung, daß ähnliche Vorgänge bei der Überwindung einer Infektion eine Rolle spielen, liegt daher nahe.

Abb. 9. Schnitt durch einen Fettkörperlappen von einer L 5 nach zweitägigem Hungern.

Während im Anfang der Kerndegeneration (in der 19°-Reihe 6 und 8 Tage nach Infektionsbeginn) die vorderen Lappen des Fettkörpers nur geringfügig gegenüber den hinteren Lappen verzögert sind, wird von 10 bis 12 Tagen an ein deutlicher Unterschied zwischen den thorakalen und den abdominalen Lappen sichtbar. In den abdominalen Lappen haben die Fettzellen nach 12 Tagen meist das Stadium C erreicht. In den thorakalen Lappen treten dagegen zwischen den degenerierten Zellen normale Fettzellen auf (Abb. 10). Durch ihre klare und leuchtende Färbung heben sie

Abb. 10. Schnitt durch einen thorakalen Fettkörperlappen, 16 Tage nach Infektionsbeginn (Ausschnitt). Zwischen die Zellen im Stadium C (FzC) sind drei normale Fettzellen (FzN) eingelagert.

sich deutlich ab von den degenerierten Zellen, die sich nur noch verwaschen anfärben. Von 27 aus der 19°-Reihe im Alter von 12 bis 18 Tagen nach Infektionsbeginn darauf untersuchten Raupen wiesen alle diese Zellen auf, die im weiteren vorerst „Ersatzzellen" genannt werden. Das Ausmaß, in dem die Ersatzzellen auftreten, ist individuell verschieden. Man findet sie häufiger in den zentralen thorakalen Lappen. Gelegentlich kommen sie noch im 1. Abdominalsegment vor, und bei einer Raupe waren sie weitgehend in die abdominalen Lappen eingelagert. Die Kerne der Ersatz-

zellen, die manchmal sehr klein sein können, entsprechen zu Beginn ihres Auftretens meist den üblichen Fettkernen, können aber auch die Anfangsstadien der Virose zeigen. Später sind sie häufig vergrößert und gelappt wie die polyploiden Kerne der älteren Raupen (vgl. S. 373).

Dem Auftreten der Ersatzzellen gehen bei den L6 Mitosen der Fettkerne voraus, die in der 19°-Reihe von 6 Tagen nach Infektionsbeginn an in den thorakalen und in den abdominalen Lappen ablaufen. 10 Tage nach Infektionsbeginn waren im Abdomen keine Mitosen mehr zu sehen, während sie im Thorax — zuletzt allerdings sehr vereinzelt — noch bis 14 Tage nach Infektionsbeginn zu beobachten waren. Diese Mitosen wurden aber nur bei einem Teil der Raupen und nicht einmal bei allen Raupen mit Ersatzzellen gefunden. Da immer nur eine gewisse Anzahl aufeinanderfolgender Schnitte — meist etwa 10 — durchgesehen wurden, wäre es denkbar, daß seltenere Fälle der Beobachtung entgangen sind.

Es ist somit nicht sicher, ob die Ersatzzellen von diesen Mitosen abzuleiten sind*, zumal die Mitosen im Abdomen nicht zu Ersatzzellen führen. Jedoch ist anzunehmen, daß die bei den L6 auftretenden Mitosen erst durch die Infektion hervorgerufen worden sind. So hat *Risler* 1950 bei *Ptychopoda seriata* festgestellt, daß der Puppenhäutung keine Teilung der Fettkerne vorausgeht. Stichprobenuntersuchungen an Vorpuppen von *C. murinana* hatten das gleiche Ergebnis, wie auch sonst das Verhalten der Fettkörperkerne von *C. murinana* während der Raupenentwicklung mit dem von *Ptychopoda seriata* übereinzustimmen scheint.

Die den Larvenhäutungen der Lepidopteren vorausgehende Mitosewelle (*Hufnagel* 1918, *Heidenreich* 1940, *Risler* 1950) läßt sich einige Tage nach Infektionsbeginn in Larven des 5. Stadiums beobachten, die eine Häutung zur L 6 vorbereiten.

Eine mitotische Proliferation der Fettzellen in granulosekranken Raupen (Pseudograsserie 1 und 2) von *Euxoa segetum* Schiff beobachtete schon *Paillot* 1936. Sie führte dazu, daß die Fettkörperlappen gesunde Zellen neben den erkrankten aufwiesen. *Martignoni* 1947 stellte an granulosekranken Raupen von *Eucosma griseana* fest, daß nicht alle Zellen erkrankten, und führte die gesunden ebenfalls auf eine Proliferation am Anfang der Erkrankung zurück.

Bei den granulosekranken Raupen von *C. murinana* bleiben die Blutzellen anscheinend noch ziemlich lange reaktionsfähig (*Wittig* 1959b). Das beruht darauf, daß in den hämopoetischen Organen — die übrigens auch im Thorax liegen — Mitosen noch 18 Tage nach Infektionsbeginn stattfinden können. Man sieht daher öfters dem thorakalen Fettkörper an- oder eingelagerte Blutzellen, in den abdominalen Lappen jedoch nur

* Nach *Poisson* 1924 und *Lazarenko* 1925 scheint bei manchen Insekten ein Wachstum des Fettkörpers durch Anlagern von Blutzellen möglich zu sein. Auch sonst bestehen Beziehungen zwischen Blut- und Fettzellen (*Liebman* 1946).

vereinzelte. Manchmal bilden die Blutzellen längere Reihen, die einer Seite eines Fettkörperlappens angelagert sind und in denen gelegentlich Mitosen vorkommen; die Blutzellen haben darin keine spindelförmige Gestalt.

Eine Infiltration des Fettkörpers mit Hämocyten fand *Paillot* 1937 bei der Pseudograsserie 3 von *Euxoa segetum;* hierbei und bei der Pseudograsserie 1 beobachtete er die Bildung von „nodules folliculeux", wie sie sonst nur bei Bakteriosen und Mikrosporidiosen beschrieben worden sind. Entsprechende Bildungen kommen bei *C. murinana* nicht vor.

Weiterhin findet man nicht nur der degenerierten Epidermis an-, ein- oder vorgelagerte Blutzellen, sondern zwischen Cuticula und Epidermis werden stellenweise ganze neue Epithellagen aus Blutzellen gebildet. In diesen „Pseudoepithelien" (*Ries* 1932), die von 14 bis 16 Tagen nach Infektionsbeginn in der 19°-Reihe zu beobachten sind, haben die Blutzellen eine spindelförmige Gestalt und liegen in mehreren Schichten übereinander. Sie können auch erste pathologische Veränderungen zeigen. Es ist möglich, daß an diesen Stellen Verletzungen vorlagen.

In der mir zugänglichen Literatur über die Histopathologie der Polyedrosen habe ich entsprechende Beobachtungen nicht gefunden. Nur *Heidenreich* 1940 gibt an, daß sich in erkrankten Puppen von *Lymantria monacha* L. die Fettzellen amitotisch vermehren.

4. *Das Fadenwerk*

Von etwa 12 Tagen nach Infektionsbeginn an (bei 19° C mittlerer Raumtemperatur), lassen sich in den degenerierten Fettzellen im Stadium C eigentümlich verschlungene, netzartige Fäden darstellen, die im folgenden mit „Fadenwerk" bezeichnet werden. Sie durchziehen die gesamte Fettzelle und stehen mit den Fadenwerken der Nachbarzellen offensichtlich nicht in Verbindung. In der stark vergrößerten „Kernregion" (s. S. 376) ist das Fadenwerk etwas dichter als in der Randzone der Fettzelle, in der die Fettvakuolen (nach Fixierung mit Osmiumsäure schwarz) noch längere Zeit erhalten bleiben. Innerhalb einer Zelle haben alle Fäden etwa die gleiche Dicke, aber von zwei Nachbarzellen kann die eine ein dünneres, die andere ein dickeres Fadenwerk enthalten. Die Dicke der Fäden schwankt ungefähr im Bereich von ½ bis 1 μ. Das Fadenwerk kann den Zerfall der Fettzelle überdauern. In normalen und in Ersatzzellen wie auch in Zellen im Stadium A oder B kommt es nicht vor. Die Epidermiszellen im Stadium C enthalten entsprechende Fadenwerke, nur sind sie hier meist auf die „Kernregion" beschränkt.

Mit Eisenhämatoxylin (s. S. 368) färben sich die Fadenwerke elektiv schwarz (Abb. 11); die anderen Partien der Zelle bleiben grau getönt. Die Zellen erscheinen wesentlich „plasmareicher" als die im Schnitt zugleich vorhandenen Ersatzzellen. Mit Methylblau-Eosin färben sich die Fadenwerke bläulich bis rötlich, gelegentlich jedoch scharf hellrot.

Das Fadenwerk ist kein Fixierungsartefakt; denn es ist auch im Gewebeausstrich sichtbar, wenn er der lebenden Raupe entnommen und unfixiert im Phasenkontrast untersucht wird (Abb. 12). Das Plasma

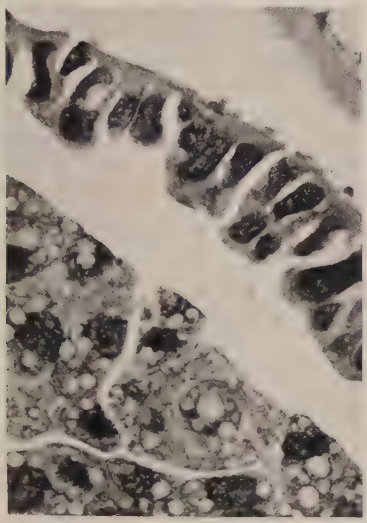

Abb. 11a

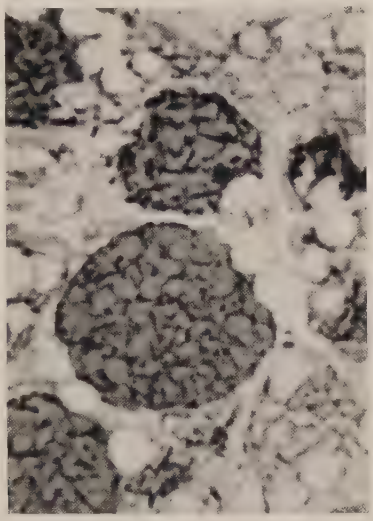

Abb. 11b

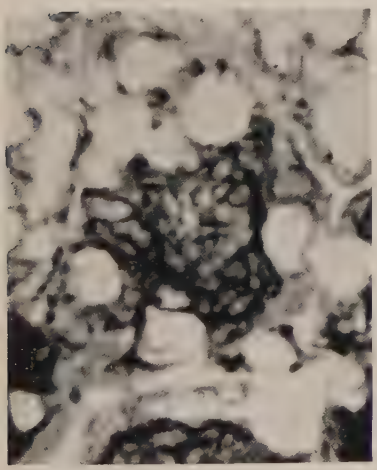

Abb. 11c

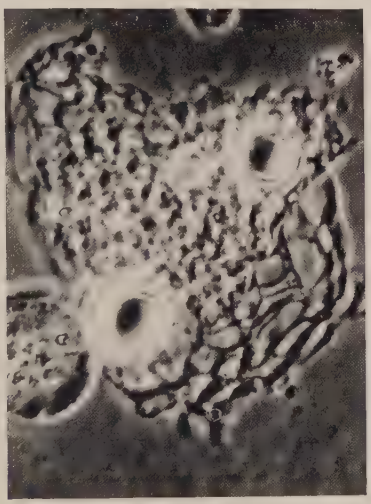

Abb. 12

Abb. 11. Fadenwerk. Fixierung: *Regaud*, Färbung: Eisenhämatoxylin nach *Heidenhain* mit HCl-Vorbehandlung. 16 Tage nach Infektionsbeginn (vgl. Abb. 5a). a) Fadenwerk in Epidermis und Fettkörper, Vergrößert 300 ×. b) Fettzellen mit Fadenwerken von sehr unterschiedlicher Dicke, Vergrößert 750 ×. c) Fettzelle mit dichtem Fadenwerk in der „Kernregion" und einzelnen Fäden im Cytoplasma zwischen den Fettvakuolen, Vergrößert 1100 ×.

Abb. 12. Unfixierter Gewebeausstrich im Phasenkontrast. Zerfallende Fettzelle mit sichtbar werdendem Fadenwerk und zwei Fetttröpfchen links unten Hämocyt., Vergrößert 900 ×.

der Fettzellen im Stadium C erscheint dann feingranuliert und leuchtend, und in ihm werden lebhafte Vibrationen sichtbar, wenn es durch den Druck des Deckglases zum Vorquellen oder Ausfließen gebracht wird. Die vibrierenden Körperchen sind nichts anderes als Viruskapseln, mit denen die Fettzellen dicht angefüllt sind.

Nach dem Vorstehenden handelt es sich also bei dem Fadenwerk um einen schwer färbbaren und feulgennegativen Eiweißkörper, der während der durch die Erkrankung bewirkten Zelldegeneration in Zellen im Stadium C herausgebildet wird. Über seine Entstehung und seine Bedeutung läßt sich nichts sagen.

Xeros 1954 beschrieb bei einer Viruserkrankung von *Tipula paludosa* Meig. ein cytoplasmatisches Netzwerk, das aber bereits im Frühstadium und um den Kern herum ausgebildet wird. Die virogenetischen Stromata der Polyedrosen sind nach *Xeros* 1956 sehr feine Netzwerke, die entweder feulgenpositiv sind und im Kern ausgebildet werden (Kernpolyedrosen), oder zu mehreren in einer Zelle im Zellplasma vorkommen (Cytoplasmapolyedrosen). Zwischen diesen Bildungen und dem Fadenwerk besteht nach dem Vorstehenden keine Ähnlichkeit. Ob das Fadenwerk mit dem endoplasmatischen Reticulum (*Palade* 1955, 1956) in Verbindung zu bringen ist, läßt sich zur Zeit ebenfalls nicht entscheiden; immerhin dürfte es im voll ausgebildeten Zustand bedeutend gröber sein, als das für die Fettzellen zu erwartende endoplasmatische Reticulum.

B. Bei Puppen und Imagines

Die Fettkörperkerne sind bei Puppen und Imagines nur noch zum Teil eiförmig-kugelig. Vielfach werden sie durch die großen Plasmavakuolen der Fettzellen eingedellt und haben dadurch eine sternförmige Gestalt. Daneben kommen große, unregelmäßig geformte (polyploide) Kerne vor (s. S. 373), in denen bei den ♀♀ öfters 2 bis 3, manchmal sogar 4 Chromozentren zu finden sind. Die Fettzellen sind mit Eiweißkristallen mehr oder weniger dicht angefüllt (Abb. 13; s. auch *Hufnagel* 1918).

Kommen Raupen trotz frühzeitiger Infektion noch zur Verpuppung, so kann man im Fettkörper der Puppen ähnliche Kernveränderungen wie bei den Raupen beobachten. Im einzelnen verhielten sich die untersuchten Puppen unterschiedlich. Die Fettzellen hatten entweder überwiegend das Stadium C erreicht und wiesen keine Eiweißkristalle auf, oder zwischen Zellen im Stadium B und C waren kleinere oder größere Mengen normaler Fettzellen eingestreut, die zum Teil Eiweißkristalle enthielten. Dementsprechend zeigte die Epidermis teilweisen oder keinen Befall.

Bei Puppen und Imagines aus Spätinfektionen (s. Tabelle 4) waren keine histologischen Veränderungen zu erkennen, obwohl manche als Raupen beträchtliche Mengen von Kapseln mit dem Futter aufgenommen haben mußten. Auch eine aus einer Infektion mittlerer Raupenstadien hervorgegangene Puppe zeigte keine histologischen Veränderungen.

C. Doppelbefall infizierter Raupen

1. *Gleichzeitige Parasitierung durch Schlupfwespenlarven*

Das für die Infektionsversuche verwendete Raupenmaterial war zum Teil parasitiert durch *Apanteles murinanae Capek* und *Zwölfer* (Braconidae, Hym.) oder durch *Glypta murinanae Bauer* (Ichneumonidae, Hym.), sehr selten auch durch *Tranosema arenicola Thoms.* (Ichneumonidae, Hym.). Bei den para-

Abb. 13. Schnitt durch den Fettkörper einer Imago (Ausschnitt von etwa fünf Zellen). Ek = Eiweißkristalle, K = Kern. Vgl. Text.

sitierten Raupen waren die Fettkörperlappen nicht so stark entwickelt wie bei den nicht parasitierten, und Kerne und Zellen waren kleiner.

Der histopathologische Ablauf der Granulose ist bei parasitierten Raupen meist verzögert. Im Anfang durchläuft nur ein Teil der Fettkörperkerne die oben beschriebene Degeneration, während der andere normal

bleibt. Dadurch wird das histopathologische Bild recht uneinheitlich, was beim normalen Krankheitsverlauf nicht der Fall ist. Fettkerne und Epidermiskerne vergrößern sich ebenfalls, erreichen aber nicht die in Tabelle 5 angegebenen Ausmaße.

Die Gewebe der parasitierenden Schlupfwespenlarven ließen keine pathologischen Veränderungen erkennen. Die Anzahl der Schlupfwespenlarven, die aus den in mittleren Stadien infizierten Raupen schlüpften, zeigte gegenüber den Kontrollen keine groben Unterschiede, und die geschlüpften Larven entwickelten sich bis zur Imago weiter. Die Parasiten wurden demnach durch die Erkrankung der Wirtslarve nicht beeinträchtigt, sondern dominierten unter den angegebenen Bedingungen.

Diese Beobachtung stimmt überein mit Erfahrungen von *Holdaway* et al. 1941, *Michelbacher* und *Smith* 1943, *Lower* 1954 und *Tanada* 1956. Ein Teil der genannten Autoren hat aber auch von einem Absterben der Parasitenlarven im viruskranken Wirt berichtet. Die an *C. murinana* gewonnenen Erfahrungen stehen ebenfalls im Einklang mit der Annahme, daß es vom Alter des Parasiten bei der Infektion der Wirtsraupe und von der Geschwindigkeit des Verlaufs der Virose abhängt, ob der Parasit dominieren kann.

2. *Gleichzeitige Erkrankung an Kernpolyedrose*

Das Vorkommen einer Kernpolyedrose bei *C. murinana* ist nahezu gleichzeitig von *Langenbuch* 1955 und *Weiser* 1956 entdeckt worden.

Herr Oberregierungsrat Dr. *R. Langenbuch*, Darmstadt, hat mir liebenswürdigerweise ein mit Eisenhämatoxylin (*Langenbuch* 1955) gefärbtes Schnittpräparat einer polyederkranken *C.-murinana*-Raupe überlassen, wofür ich ihm an dieser Stelle herzlich danken möchte. Nach seinen Beobachtungen entsprechen die histopathologischen Veränderungen dem für Kernpolyedrosen Bekannten (*Bergold* 1943, *Bird* und *Whalen* 1954, *Heidenreich* 1940, *Krieg* und *Langenbuch* 1956 b, *Paillot* 1936, *Steinhaus* 1948, 1949, *Xeros* 1953 a und b).

Die größten, in diesem Präparat vorkommenden Polyeder hatten einen Durchmesser von 1,8 μ. Die befallenen Kerne zeigten die bekannten Stadien der Kernpolyedrose: Kerneinschluß mit optisch leerer Ringzone, Granulationen in der Ringzone, kleinere Polyeder in der Ringzone und ganzer Kern mit kleineren oder größeren Polyedern dicht angefüllt, wobei zuletzt der Kerneinschluß nicht mehr feststellbar war. Der Kern vergrößerte sich dabei sehr stark, die in einem Kern vorkommenden Polyeder waren alle gleich groß, und das Plasma blieb unverändert.

Der Befall der Lappen des Fettkörpers war sehr unregelmäßig. Manche Partien waren gar nicht befallen, während in anderen die Kerne dicht mit Polyedern angefüllt waren. Die Anfangsstadien der Kernveränderung traten nur selten auf. Mitosen wurden nicht gefunden. Die nicht befallenen Kerne hatten meist eine sternförmige Gestalt wie die Fettkerne der Vorpuppen und Puppen (s. S. 384). In die Lappen waren einzelne Fettzellen mit normalen Kernen eingestreut, die in ihrem Plasma dunkel gefärbte, rundliche oder ovale Eiweißkristalle von unterschiedlicher Größe enthielten (s. auch *Krieg* 1957 a). Zwischen den peripheren und den zentralen, den thorakalen und den abdominalen Lappen bestanden keine wesentlichen Unterschiede.

Im Gegensatz zum Fettkörper war der Befall der Kerne in der Epidermis ziemlich gleichmäßig. Die Kerne waren meist mit Polyedern angefüllt, zum Teil auch noch im Anfangsstadium der Virose. Durch die starke Vergrößerung der Kerne hatte sich das Epithel bis auf 50 μ erhöht. Die Tracheen fielen auf durch die stark vergrößerten und meist mit Polyedern angefüllten Kerne der Matrixzellen.

Weiterhin waren stark befallen die Blutzellen, die Zellen der Flügelanlagen* und die Ganglienzellen. Keine Veränderungen waren erkennbar an Oenocyten, Pericardialzellen (abgesehen von einer möglichen Vergrößerung), Mitteldarm, Speicheldrüsen, Malipighischen Gefäßen und Muskeln (möglicherweise Befall der Muskelhülle). In der Leibeshöhle kamen freie Polyeder vor. Die Geschlechtsorgane waren in dem Präparat nicht getroffen.

Unter den mit der Granulose infizierten Raupen hatte sich in einem Fall eine Doppelinfektion mit der Kernpolyedrose entwickelt (23,5°-Reihe, Fixierung 11 Tage nach Infektionsbeginn, Färbung mit *Feulgen*). Die Granulose war in dem diesem Fixierungsalter entsprechenden, sehr fortgeschrittenen Stadium und hatte zu den üblichen Veränderungen in Fettkörper, Epidermis, Muskeln und Oenocyten geführt. Die Polyedrose befand sich dagegen in einem früheren Stadium, und nur ein Teil der befallenen Kerne enthielt Polyeder. Bei dem anderen Teil war das Chromatin verklumpt, oder es hatten sich ein feulgenpositiver, manchmal netzartig strukturierter Kerneinschluß, die Ringzone und das perinucleare Chromatin herausgebildet. Von der Polyedrose waren befallen: ein kleinerer Teil der thorakalen Fettzellen (offensichtlich Ersatzzellen), die Matrix der Tracheen (mit Ausnahme weniger, von der Granulose befallener Zellen), Epidermiszellen in der Randzone der Flügelanlagen und in der Randzone der Imaginalscheiben der Beine, ein kleinerer Teil der Blutzellen (u. a. auch in den Partien der hämopoetischen Organe, in denen keine Mitosen vorkamen), das Pseudoepithel.

Ein Befall mit der Kernpolyedrose war also in allen den Geweben erfolgt, die von der Granulose üblicherweise nicht betroffen werden, aber zum Befallsbereich der Polyedrose gehören. Dabei kamen polyedrose- und granulosekranke Zellen im gleichen Gewebe nebeneinander vor.

Somit kann den nach *Steinhaus* 1957 bisher in 4 Fällen beobachteten Doppelinfektionen Granulose-Kernpolyedrose eine weitere Lepidopterenart zugefügt werden. Auf ihre Histopathologie ist nur *Paillot* 1936 eingegangen. Er fand im Fettkörper von *Euxoa segetum* ebenfalls beide Krankheiten nebeneinander sowie nicht erkrankte Zellen. Der Bereich der Gewebsspezifität scheint also bei derartigen Doppelinfektionen für jede der beiden Virosen erhalten zu bleiben.

* Ein Befall der Imaginalanlagen mit Kernpolyedrose wurde bisher nur von *Smith* und *Xeros* 1954a beobachtet. Sie haben auch Plasmapolyeder in den Zellen der Regenerationskrypten des Mitteldarms gefunden. Allerdings hatte schon *Bergold* 1943 festgestellt, daß sich Kernpolyeder in Zellen bilden können, die gerade aus einer Teilung hervorgegangen sind.

V. Diskussion

Granulosen als Viruskrankheiten der Insekten sind seit den Untersuchungen *Paillots* 1926—1937 an *Pieris brassicae* L. und *Euxoa segetum* bekannt; die für ihre Erreger eigentümliche Kapselbildung wurde aber erst von *Bergold* 1948 an *Choristoneura (Cacoecia) murinana* nachgewiesen. Seitdem ist eine große Zahl von Granulosen an Lepidopterenraupen gefunden und untersucht worden. In einem Teil dieser Arbeiten wurden auch histopathologische Veränderungen beschrieben oder Angaben dazu gemacht (*Paillot* 1926, 1936, 1937, *Steinhaus* 1947, *Bergold* 1948, *Steinhaus, Hughes* und *Wasser* 1949, *Steinhaus* und *Thompson* 1949, *Hughes* und *Thompson* 1951, *Bucher* 1953, *Tanada* 1953, *Smith* und *Xeros* 1954b, *Martignoni* 1954, 1957, *Smith* und *Rivers* 1956). Ein Hauptproblem war dabei, den Entstehungsort der Viruskapseln zu finden, der teils im Plasma, teils im Kern vermutet wurde. Hinsichtlich der histopathologischen Veränderungen mußte sich ein Teil der Untersuchungen auf die Beschreibung einzelner Stadien beschränken; doch schon *Paillot* 1936 versuchte, durch stufenweise Fixierung zu einem vollständigen Krankheitsverlauf zu kommen, wie es später von *Tanada* 1953 und *Martignoni* 1957 durchgeführt wurde.

In den genannten Arbeiten wurden die Kernveränderungen beschrieben als Pyknosen mit darauffolgender Karyolyse (mit Ausnahme der Granulose von *Peridroma margaritosa* Haw., *Steinhaus, Hughes* und *Wasser* 1949), die von einer Vergrößerung des Kerns und der ganzen Zelle begleitet werden. Sie laufen entweder ausschließlich oder zuerst im Fettkörper ab, wobei die Fettzellen ihre Vakuolen erst im Spätstadium verlieren oder schon zu Beginn der Erkrankung. Werden noch andere Gewebe befallen, so ist es vor allem die Epidermis (auch „Hypodermis" bezeichnet), in der sich die gleichen Erscheinungen wie im Fettkörper, nur etwas verzögert, abspielen. Gelegentlich wurde ein Befall der Tracheen beobachtet. Pathologische Veränderungen in der Muskulatur wurden nicht beschrieben, aber mehrfach wurde angegeben, daß erkrankte Raupen ihre Beweglichkeit verlieren.

Es war ein glücklicher Umstand bei der Untersuchung der Granulose von *C. murinana*, daß die Erkrankung hier sehr viel langsamer ablief als bei den meisten anderen untersuchten Granulosen. Dadurch konnten Zwischenstadien erfaßt werden.

Die pathologischen Veränderungen in den Kernen lassen sich nunmehr beschreiben als eine Kerndegeneration, bei der zunächst schollenartige Chromatinpyknosen entstehen, welche anscheinend zu feulgenpositiven „Schwaden" aufgelöst werden und verschwinden. Dabei verschwinden auch die Nucleolen (nach charakteristischen Veränderungen im Anfangsstadium). Die „Kernregion" im Stadium C hat die für den Kern

typischen geformten Bestandteile verloren, so daß eine Unterscheidung zwischen Kern und Plasma mit den üblichen histologischen Methoden kaum noch möglich ist (s. auch *Hughes* und *Thompson* 1951). Dieser Sachverhalt wurde vielfach als „Reißen" oder „Verschwinden" der Kernmembran beschrieben. Es dürfte also zu einer Sache der Definition werden, ob man die verbleibende Region noch als Kern bezeichnen will oder nicht.

Das Erhaltenbleiben oder Verschwinden der Fettvakuolen ist dagegen kein wesentliches Merkmal für die Krankheit.

Hinsichtlich des Befalls der Gewebe ergibt sich aus der vorliegenden Untersuchung, daß die für die Granulose charakteristischen Kernveränderungen zuerst im Fettkörper sichtbar werden und vor allem hier und in der Epidermis ablaufen. Ein Befall der Tracheen erfolgt nur gelegentlich. Darüber hinaus kommt es zu einer Degeneration der Muskeln, zu Veränderungen in den Oenocyten und zur Degeneration der Blutzellen (*Wittig* 1959b).

Im Endstadium der Erkrankung tritt in den Fett- und Epidermiszellen ein Fadenwerk mit bestimmten Eigenschaften hinsichtlich seiner Färbbarkeit auf. Es ist ebenfalls als histopathologisches Charakteristikum der Granulose anzusehen und dürfte nicht nur bei *C. murinana* vorkommen. So erwähnen *Hughes* und *Thompson* 1951 bei *Sabulodes caberata Guenée* ein „darker staining network"*.

Der Nachweis der Kapseln selbst in ihren Wirtszellen ist bei lichtmikroskopischer Untersuchung problematisch. Im feuchten Gewebeausstrich läßt sich zwar feststellen, daß Fettzellen im fortgeschrittenen Stadium dicht mit Kapseln angefüllt sind (z. B. *Steinhaus* 1947, *Hughes* und *Thompson* 1951 und eigene Beobachtungen). Für das mikroskopische Schnittpräparat kennen wir jedoch noch keine Technik, die einen sicheren Kapselnachweis garantiert. Nach eigenen Beobachtungen an lufttrockenen Blutausstrichen verschwinden die Kapseln in den üblichen Einschlußmitteln für Dauerpräparate. *Krieg* (persönliche Mitteilung) stellte fest, daß Kapseln von *C. murinana* nach einer 35 Minuten dauernden Hydrolyse in n-HCl bei 58° C zwar ihre starke Lichtbrechung verlieren, sich aber nicht mit *Feulgen* und — im Gegensatz zu Polyedern von *Bombyx mori* L. — nur undeutlich mit Lichtgrün und Eisen-

* Herr Dr. *F. T. Bird*, Sault Ste. Marie, Ont. (Kanada) hat mir freundlicherweise bereits während der Drucklegung fast das gesamte Manuskript seiner Arbeit über die Granulose von *Choristoneura fumiferana* Clem., *Pieris brassicae* L. und *Eucosma griseana* Hbn. übersandt, wofür ich ihm an dieser Stelle bestens danken möchte. Danach werden bei diesen Arten den Fadenwerken völlig entsprechende „strands" in den Zellen des Fettkörpers, der Epidermis und der Tracheenmatrix gebildet. Diese Zellen weisen auch schwach feulgenpositive Bezirke auf, die als Kapselmassen gedeutet werden. Als degenerative Veränderungen der Fettkerne werden Verklumpung und feine Granulierung des Kernmaterials genannt (elektronenoptische Untersuchung). Ferner wird darauf hingewiesen, daß der Infektionsprozeß bei allen drei Krankheiten in ähnlicher Weise abläuft. Diese Befunde stehen im Einklang mit der obigen Charakteristik der histopathologischen Veränderungen.

hämatoxylin darstellen lassen. Auf der anderen Seite wird in der Literatur mehrfach von mit Hämatoxylin grau gefärbten, „parasitischen Massen" gesprochen. *Tanada* 1953 schreibt z. B.: "The areas between the nuclear-membrane and the dark-staining nuclear material were filled with a homogenous light-staining material, probable the granules." *Smith* und *Xeros* 1954b beobachteten, daß "round to sausage-shaped areas of more lightly staining chromatic material develop and gradually loose their capacity for taking basic stains", und weiterhin: "Many of the sausage-shaped bodies can be seen breaking up in minute granules . . .". Bei diesen homogenen, leicht gefärbten Substanzen könnte es sich auch um die feulgenpositiven „Schwaden" der B-Kerne handeln, die aber wegen ihrer Färbbarkeit keine Kapseln sein können. Es bleibt also eine Aufgabe der elektronenoptischen Untersuchung, festzustellen, wann und wo die ersten Viren und Kapseln in der Fettzelle auftreten und wie sie den pathologischen Veränderungen dieser Zellen zuzuordnen sind*.

Die bei den Lepidopterenraupen bisher bekannten, von einer Granulose hervorgerufenen histopathologischen Veränderungen stimmen einerseits untereinander weitgehend überein und unterscheiden sich andererseits in charakteristischer Weise von den durch Kernpolyedrosen bewirkten histopathologischen Veränderungen. In der Tabelle 7 ist das am Beispiel *C. murinana* dargestellt worden. Da derartige Unterschiede auch gegenüber den von anderen Krankheitsgruppen (z. B. Plasmapolyedrosen) hervorgerufenen histopathologischen Veränderungen bestehen, können die oben geschilderten histopathologischen Erscheinungen als spezifisch für einen bestimmten Granulosetyp angesehen werden**. Ähnliche Überlegungen dürften schon *Paillot* 1936, 1937 dazu bewogen haben, allein an Hand von histopathologischen Veränderungen bei *Euxoa segetum* drei verschiedene Granulosen (Pseudograsserie 1, 2 und 3) zu beschreiben.

Der Wert einer schon allein mit dem Lichtmikroskop betriebenen Histopathologie für die Insektenpathologie beruht somit auf ihrer vergleichenden Methode, durch welche spezifische Eigenschaften einer Krankheitsgruppe erfaßt werden können. Dadurch kann die Gesamtheit der histopathologischen Veränderungen für die Diagnose der Viruskrankheiten der Insekten von unmittelbarer Bedeutung werden (vgl. *Steinhaus* 1949, S. 5).

Die Problematik solcher Diagnosen ist von *Krieg* 1955, 1957a in Verbindung mit den Schwierigkeiten einer Ausstrichdiagnose erörtert worden. Dabei hat *Krieg* bestimmte Mindestanforderungen (analog den *Koch*schen Postulaten) aufgestellt, welche den Erreger der Virose bestreffen. Nach dem Vorstehenden dürfte die Bedeutung des histopathologischen Befunds (einschließlich der cytologischen Veränderungen) für eine differenzierte Diagnose jedoch wesentlich größer sein.

* In seinen neuen elektronenoptischen Untersuchungen kommt *Bird* 1958 zu dem Ergebnis, daß Viren und Kapseln im Plasma der Fett- und Epidermiszellen, der Tracheenmatrix und der Blutzellen entstehen.

** Die von *Smith, Hughes, Dunn* und *Hall* 1956 bei *Harrisina brillians* B. und McD. festgestellte, die Darmzellen befallende Granulose würde einem anderen Typ angehören.

Tabelle 7. Histopathologische Veränderungen bei Raupen von *Choristoneura murinana* nach Erkrankung an Granulose bzw. Kernpolyedrose

	Granulose	Kernpolyedrose
I. *Typische Kernveränderung*	Vergrößerung Schollenartige Chromatinpyknosen Auflösung zu feulgenpositiven Schwaden Verschwinden der feulgenpositiven Substanz	Vergrößerung Kerneinschluß netzartige Strukturierung langsames Verschwinden
II. *Befall der Gewebe*		
Epidermis	t. K., vollständig befallen	t. K., vollständig befallen
Imaginalanlagen	kein Befall	t. K., ± vollständig befallen
Tracheen	t. K., Befall gelegentlich und spät	t. K., vollständig befallen
Fettkörper	t. K., vollständig befallen (Ersatzzellen nicht befallen)	t. K., Befall partienweise (Ersatzzellen in Mischinfektion befallen)
Muskeln	Degeneration	keine Veränderung (?)
Blutzellen	oft atyp. Kerndegeneration (in den hämopoetischen Organen nicht verändert) Phagocytose der Kapseln (s. *Wittig* 1959b)	oft t. K. (bei Mischinfektion Zellen in den hämopoetischen Organen z. T. befallen) Phagocytose nicht untersucht
Oenocyten	verändert	nicht verändert
Pericardialzellen	nicht verändert (?)	nicht verändert (?)
Ganglien	nicht verändert	t. K.
Geschlechtsorgane	nicht verändert	nicht untersucht*
Speicheldrüsen, Mitteldarm, Malpighische Gefäße	nicht verändert	nicht verändert
III. *Spezifische Bildungen* in den befallenen Geweben	Kapseln Fadenwerk	Polyeder –

* bei anderen Arten Befall beobachtet (*Smith* und *Xeros* 1954a)
t. K. = Typische Kernveränderung

Von den histopathologischen Veränderungen sind sicherlich viele eine morphologische Manifestation von Wirkungen, die zwischen Wirtszellen bzw. Wirtsorganismus und Erreger stattgefunden haben. Daher vermag eine histopathologische Untersuchung in begrenztem Maße auch Anhaltspunkte hierfür zu liefern. So könnten z. B. folgende Befunde zu Ansatzpunkten einer physiologischen Untersuchung werden: Obwohl die Epidermiszellen erkranken, erkranken die embryonalen Zellen der Imaginalscheiben nicht; ein Teil der Ersatzzellen wird nicht befallen, während die Fettzellen sonst befallen werden. Entsprechende Unterschiede waren bei der Kernpolyedrose nicht zu beobachten, wie sie überhaupt in einer größeren Zahl von Geweben typische Kernveränderungen hervorrief als die Granulose. Ferner kann der Ablauf der Granulose durch die Temperatur und durch eine gleichzeitig bestehende Parasitierung verändert werden. Infektionsbedingte Mitosen und Ersatzzellen im Fettkörper wie auch die Reaktion des Blutes auf die Infektion lassen an Abwehrvorgänge denken, die am Zustandekommen einer Resistenz beteiligt sein können. Histopathologische Untersuchungen können also vielleicht ein Hilfsmittel bei der Untersuchung von physiologischen Vorgängen sein, die über den Erfolg oder Mißerfolg einer Infektion entscheiden. Dies könnte sowohl für das theoretische Verständnis einer Viruskrankheit, als auch für die Praxis von Wichtigkeit werden.

Zusammenfassung

1. *An per os massiv infizierten Raupen von Choristoneura murinana (Hb.) wurde der Verlauf der Granulose durch stufenweise Fixierung verfolgt. Schon vor dem Auftreten der äußeren Symptome ist an den infizierten Raupen eine Verzögerung der Entwicklung und eine Verringerung der Kopfkapselbreite zu erkennen. Die äußeren Symptome selbst sind unspezifisch. Die Geschwindigkeit des Krankheitsverlaufs hängt ab von der Zuchttemperatur, der Infektionserfolg vom Alter der Raupen bei der Infektion.*

2. *Mit der pathologischen Vergrößerung der Fett- und Epidermiszellen geht Hand in Hand eine Degeneration, bei der im Kernraum Chromatinpyknosen und feulgenpositive „Schwaden" gebildet werden und wieder verschwinden. Dabei verschwinden auch die Nucleolen. Im Endstadium wird in der befallenen Zelle unter bestimmten Bedingungen ein eigentümliches Fadenwerk sichtbar.*

3. *Von den verschiedenen Geweben der Raupe unterliegt der eine Teil histopathologischen Veränderungen, während der andere keine Beeinträchtigung erkennen läßt. Andere Vorgänge können offensichtlich als Anfänge einer Regeneration gewertet werden.*

4. *In Einzelfällen wurden histopathologische Veränderungen auch bei Puppen, in keinem Falle aber bei Puppen und Imagines aus Spätinfektionen*

beobachtet. Bei Parasitierung durch Schlupfwespenlarven waren die histopathologischen Veränderungen verzögert und uneinheitlich; die Parasiten wurden jedoch durch die Krankheit des Wirts nicht beeinträchtigt. Eine Doppelinfektion Granulose-Kernpolyedrose zeigte das übliche Bild einer Granulose. (Das histopathologische Bild der Kernpolyedrose entsprach dem für diese Gruppe Bekannten.)

5. *Die von anderen granulosekranken Lepidopterenraupen bekannten histopathologischen Veränderungen stimmen untereinander weitgehend überein und entsprechen den bei C. murinana auftretenden Bildern. Sie unterscheiden sich in charakteristischer Weise von den bei Kernpolyedrosen auftretenden Veränderungen. Daher können sie in ihrer Gesamtheit als spezifische Merkmale eines bestimmten histopathologischen Typs der Granulose angesehen werden. Dadurch geben sie dem histopathologischen Befund eine Bedeutung bei der Stellung einer differenzierten Diagnose.*

Literatur

(Mit * bezeichnete Arbeiten waren nur im Referat zugänglich.)

Arvy, L.: Données histologiques sur la leucopièse chez quelques Lépidoptères. Bull. Soc. zool. France **78,** 45—49 (1953). — *Bergold, G. H.:* Über Polyederkrankheiten bei Insekten. Biol. Zbl. **63,** 1—55 (1943). — *Bergold, G.H.:* Über die Kapselviruskrankheit. Z. f. Naturforsch. **3b,** 338—342 (1948). — *Bird, F. T.:* Histopathology of granulosis viruses in insects. Canad. J. Microbiol. **4,** 267—271 (1958). — *Bird, F. T.* and *M. M. Whalen:* A nuclear and a cytoplasmic polyhedral virus disease of the spruce budworm. Canad. J. Zool. **32,** 82—86 (1954). — *Bucher, G. E.:* Biotic factors of control of the European fir budworm, *Choristoneura murinana* (Hbn.) (N. Comb.), in Europe. Canad. J. Agric. Sci. **33,** 448—469 (1953). — J. R. Geigy AG., Basel: Wissenschaftliche Tabellen. Ausgabe 1955. — *Heidenreich, E.:* Die Polyederkrankheit der Nonne. I. Histologische Untersuchungen. Arch. Virusforsch. (Wien) **1,** 582—644 (1940). — * *Holdaway, F. G.* et al.: Entomology. Rept. Hawaii Agr. Expt. Sta., 1940 (1941). — *Hufnagel, A.:* Recherches histologiques sur la métamorphose d'un Lépidoptère (*Hyponomeuta padella* L.). Arch. Zool. exp. gén. **57,** 47—202 (1918). — *Hughes, K. M.:* Development of the inclusion bodies of a granulosis virus. J. Bacter. **64,** 375—380 (1952). — *Hughes, K. M.:* The development of the insect virus within cells of its host. Hilgardia **22,** 391—406 (1953). — *Hughes, K. M.* and *C. G. Thompson:* A granulosis of the omnivorous looper, *Sabulodes caberata* Guenee. J. inf. Dis. **89,** 173—179 (1951). — *Krieg, A.:* Zur Differentialdiagnose von Viruskrankheiten bei Insekten. Mikroskopie **10,** 258—262 (1955). — *Krieg, A.:* Zur Differentialdiagnose von Viruskrankheiten bei Insekten. II. Mitt. Mikroskopie **12,** 110—117 (1957a). — *Krieg, A.:* „Toleranzphänomen" und Latenzproblem. III. Mitt.: Untersuchungen über die Polyedrose von *Neodiprion sertifer* (Geoffr.). Arch. Virusforsch. (Wien) **7,** 212—219 (1957b). — *Krieg, A.* und *R. Langenbuch:* Über eine Polyedrose von *Dasychira pudibunda* L. (Lepidoptera, Lymantriidae). Arch. Virusforsch. (Wien) **7,** 18—27 (1956a). — *Krieg A.* und *R. Langenbuch:* Eine Polyedrose von *Aporia crataegi* L. (Lepidoptera). I. Mitt. Z. Pflanzenkrankh. **63,** 95—99 (1956b). — *Langenbuch, R.:* Eine verbesserte und zeitsparende Methode zur Färbung von Viruseinschlußkörpern (Polyedern)

in Schnittpräparaten mit Eisenhämatoxylin. Mikroskopie **10**, 344—348 (1955). — *Lazarenko, T.:* Beiträge zur vergleichenden Histologie des Blutes und des Bindegewebes. II. Die morphologische Bedeutung der Blut- und Bindegewebselemente der Insekten. Z. mikrosk.-anat. Forsch. **3**, 409—499 (1925). — *Liebman, E.:* On trephocytes and trephocytosis; a study on the role of the leucocytes in nutrition and growth. Growth **10**, 291—330 (1946). — **Lower, H. F.:* A granulosis virus attacking the larvae of *Persectania ewingii* Westw. (Lepidoptera, Agrotidae) in South Australia. Austral. J. Biol. Sci. **7**, 161—167 (1954). — *Martignoni, M. E.:* Über zwei Viruskrankheiten von Forstinsekten im Engadin. Mitt. Schweiz. ent. Ges. **27**, 147—152 (1954). — *Martignoni, M. E.:* Contributo alla conoscenza di una granulosi di *Eucosma griseana* (Hübner) (Tortricidae, Lepidoptera) quale fattore limitante il pullulamento dell'insetto nella Engadina alta. Mitt. Schweiz. Anst. f. d. forstl. Versuchswesen **32**, 371—418 (1957). — *Michelbacher, A. E.* and *R. F. Smith:* Some natural factors limiting the abundance of the alfalfa butterfly. Hilgardia **15**, 369—397 (1943). — *Paillot, A.:* Sur une nouvelle maladie du noyau ou grasserie des chenilles de *Pieris brassicae* et un nouveau groupe de microorganismes parasites. Compt. Rend. Acad. Sci., Paris **182**, 180—182 (1926). — *Paillot, A.:* Contribution à l'étude des maladies à ultravirus des insectes. Ann. Epiphyt. Phytogénét. **2**, 341—379 (1936). — *Paillot, A.:* Nouveau type de pseudo-grasserie observé chez les chenilles d'*Euxoa segetum*. Compt. Rend. Acad. Sci., Paris **205**, 1264—1266 (1937). — *Palade, G. E.:* Studies on the endoplasmic reticulum. II. Simple disposition in cells in situ. J. biophys. biochem. Cytology **1**, 567—582 (1955). — *Palade, G. E.:* The endoplasmic reticulum. Ibid. **2**, Suppl. 85—99 (1956). — *Poisson, R.:* Contribution à l'étude des Hémiptères aquatiques. Bull. Biol. France Belg. **58**, 49—305 (1924). — *Ries, E.:* Experimentelle Symbiosestudien: 1. Mycetomtransplantation. Z. Morphol. Ökol. **25**, 184—234 (1932). — *Risler, H.:* Kernvolumenänderungen in der Larvenentwicklung von *Ptychopoda seriata* Schrk. Biol. Zbl. **69**, 11—28 (1950). — *Romeis, B.:* Mikroskopische Technik. Leibniz Verlag, München (1948). — *Smith, K. M.* and *C. F. Rivers:* Some viruses affecting insects of economic importance. Parasitology **46**, 235—242 (1956). — *Smith, K. M., R. W. G. Wyckoff,* and *N. Xeros:* Polyhedral virus disease affecting the larvae of the privet hawk moth (*Sphinx ligustri*). Parasitology **42**, 287—289 (1953). — *Smith, K. M.,* and *N. Xeros:* Development of virus in the cell nucleus. Nature (London) **172**, 670—671 (1953). — *Smith, K. M.* and *N. Xeros:* Electron and light microscope studies of the development of the virus rods of insect polyhedroses. Parasitology **44**, 71—80 (1954a). — *Smith, K. M.* and *N. Xeros:* A comparative study of different types of viruses and their capsules in the polyhedroses and granuloses of insects. Parasitology **44**, 400—406 (1954b). — *Smith, O. J., K. M. Hughes, P. H. Dunn,* and *I. M. Hall:* A granulosis virus disease of the western grape leaf skeletonizer and its transmission. Canad. Entomologist **88**, 507—514 (1956). — *Steinhaus, E. A.:* A new disease of the variegated cutworm, *Peridroma margaritosa* (Haw.). Science **106**, 323 (1947). — *Steinhaus, E. A.:* Polyhedrosis ("wilt disease") of the alfalfa caterpillar. J. econ. Ent. **41**, 859—865 (1948). — *Steinhaus, E. A.:* Principles of insect pathology. McGraw-Hill Book Company, Inc., New York, Toronto, London (1949). — *Steinhaus E. A.:* New records of insect-virus diseases. Hilgardia **26**, 417—430 (1957). — *Steinhaus, E. A., K. M. Hughes,* and *H. B. Wasser:* Demonstration of the granulosis virus of the variegated cutworm. J. Bacter. **57**, 219—224 (1949). — *Steinhaus, E. A.* and *C. G. Thompson:* Granulosis disease in the buckeye caterpillar, *Junonia*

coenia Hübner. Science **110,** 276—278 (1949). — *Tanada, Y.:* Description and characteristics of a granulosis virus of the imported cabbageworm. Proc. Haw. ent. Soc. **15,** 235—260 (1953). — **Tanada, Y.:* Microbial control of some lepidopterous pests of crucifers. J. Econ. Ent. **49,** 320—329 (1956). — **Weiser, J.:* Die Krankheiten des Tannentriebwicklers *Cacoecia murinana* Hb. in der Mittelslowakei (CSR). Z. Pflanzenkrankh. **63,** 193—197 (1956). — *Wittig, G.:* Ein Beitrag zur Histopathologie der Kapselvirose von *Choristoneura murinana* (Hbn.) (Lepidopt., Tortricidae). Verh. IV. Internat. Pflanzenschutzkongreß, Hamburg. Im Druck (1957). — *Wittig, G.:* Morphologie und Entwicklung der Raupen des Tannentriebwicklers *Choristoneura murinana* (Hb.) (Lepidopt., Tortricidae). I. Die Unterscheidung der Larvenstadien. Im Druck. (1959a). — *Wittig, G.:* Untersuchungen am Blut gesunder und granulosekranker Raupen von *Choristoneura murinana* (Hb.) (Lepidopt., Tortricidae). Im Druck. (1959b). — *Wittig, G.* und *J. Franz:* Zur Histopathologie der Granulose von *Choristoneura murinana* (Hbn.) (Lepidopt., Tortricidae). Naturwiss. **44,** 564—565 (1957). — *Xeros, N.:* Development of intranuclear inclusions in virus diseased cells of lepidopterous larvae. Nature (London) **172,** 309—310 (1953a). — *Xeros, N.:* Origin and fate of the virus bundles in nuclear polyhedroses. Nature (London) **172,** 548—549 (1953b). — *Xeros, N.:* A second virus disease of the leatherjacket, *Tipula paludosa.* Nature (London) **174,** 562—563 (1954). — *Xeros, N.:* The virogenic stroma in nuclear and cytoplasmic polyhedroses. Nature (London) **178,** 412—413 (1956).

Printed in Austria